

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

B58

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/07239 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Februar 1997 (27.02.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/03595 (22) Internationales Anmeldedatum: 14. August 1996 (14.08.96) (30) Prioritätsdaten: 195 30 132.3 16. August 1995 (16.08.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V., BERLIN [DE/DE]; Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Oliver [DE/DE]; Harnackstrasse 61, D-44139 Dortmund (DE). DEUTER, Rainer [DE/DE]; Am Westheck 36, D-44309 Dortmund (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: PROCESS FOR PURIFYING, STABILISING OR ISOLATING NUCLEIC ACIDS FROM BIOLOGICAL MATERIALS (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR REINIGUNG, STABILISIERUNG ODER ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN AUS BIOLOGISCHEN MATERIALIEN (57) Abstract The invention relates to a process for purifying, stabilising and/or isolating nucleic acids from biological materials, said process being characterized in that an adsorption matrix based on carbohydrates (e.g. potato flour) is added to a sample of biological materials containing nucleic acids in order to bind impurities. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung, Stabilisierung oder/und Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, dadurch gekennzeichnet, dass man einer Nukleinsäure enthaltenden Probe aus biologischen Materialien eine Adsorptionsmatrix auf Kohlenhydratbasis (z.B. Kartoffelmehl) zur Bindung von Verunreinigungen zusetzt.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Gambia	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LU	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MD	Republik Moldau	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
EE	Estland	ML	Mali	UG	Uganda
ES	Spanien	MN	Mongolei	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MR	Mauritien	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MW	Malawi	VN	Vietnam
GA	Gabon				

- 1 -

Verfahren zur Reinigung, Stabilisierung oder Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stabilisierung, Reinigung oder/und Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien durch Entfernung von Verunreinigungen, z.B. von Nukleinsäuren schädigenden und enzymatische Reaktionen hemmenden Substanzen. Dieses Verfahren ist insbesondere zur Analyse, zum Nachweis oder zur Isolierung von Nukleinsäuren in Stuhlproben geeignet. Weiterhin wird ein für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignetes Reagenzienkit offenbart.

Zahlreiche Beispiele aus verschiedenen Forschungsbereichen belegen die Bedeutung der Analyse von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, die mit Substanzen verunreinigt sind, welche Nukleinsäuren während der Lagerung schädigen und eine enzymatische Manipulation der Nukleinsäuren, z.B. durch Amplifikation hemmen. Daher ist es für die Brauchbarkeit der in den biologischen Materialien enthaltenen Nukleinsäuren für weitere Analysen wichtig, daß diese Substanzen nur in sehr niedrigen Konzentrationen vorhanden sind oder gänzlich aus der Probe entfernt werden.

Eine besondere Bedeutung besitzt die Analyse von Nukleinsäuren aus fäkalen Proben. Die medizinische Hauptanwendung ist der Nachweis tumorspezifischer Veränderungen von nukleärer DNA aus Stuhl, die als Parameter bei der Frühdiagnose von Tumoren des Verdauungstrakts dienen können. Ebenso gewinnt der Nachweis bakterieller und viraler Infektionserreger aus Stuhlproben durch auf Nukleinsäuren basierende Testverfahren zunehmend an Bedeutung.

- 2 -

Eine Methode zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Stuhl wird in WO 93/20235 offenbart. Diese Methode ergibt jedoch nur geringe Ausbeuten an Nukleinsäuren. Weiterhin werden DNA-schädigende oder/und PCR-hemmende Substanzen nicht abgetrennt. Daher kann die isolierte DNA nicht über längere Zeit gelagert werden und eine Amplifikation zur Vermehrung spezifischer, zu analysierender Genabschnitte dieser DNA liefert keine reproduzierbaren Ergebnisse. Ein besonders schwerwiegender Nachteil des bekannten Verfahrens besteht darin, daß bei der PCR-Amplifikation keine intakten DNA-Fragmente mit einheitlicher Sequenz entstehen, die für eine weitere Analyse notwendig sind. Um diese zu erhalten, ist eine aufwendige Klonierung der amplifizierten Genabschnitte notwendig. Noch ein weiterer Nachteil des Verfahrens des Standes der Technik besteht darin, daß die stark gesundheitsschädigenden Lösungsmittel Phenol und Chloroform verwendet werden müssen.

Eine der vorliegenden Erfindung zugrunde liegenden Aufgabe war somit die Bereitstellung eines Verfahrens, mit dem Nukleinsäuren in biologischen Materialien gegen Abbau stabilisiert und bei dem die enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren hemmende Substanzen abgetrennt werden können. Insbesondere soll ein Verfahren bereitgestellt werden, das eine zuverlässige Isolierung von Nukleinsäuren aus fäkalen Proben ermöglicht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Reinigung, Stabilisierung oder/und Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man einer Nukleinsäuren enthaltenden Probe aus biologischen Materialien eine Adsorptionsmatrix zur Bindung von Verunreinigungen zusetzt und anschließend die Nukleinsäuren gegebenenfalls von gebundenen Verunreinigungen abtrennt. Das Inkontaktbringen der Nukleinsäuren enthaltenden Probe mit der Adsorptionsmatrix kann direkt oder nach Aufnehmen der Probe in Flüssigkeit erfolgen.

- 3 -

Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann die Brauchbarkeit von aus biologischen Materialien isolierten Nukleinsäuren, insbesondere DNA, deutlich verbessert werden. Weiterhin werden durch den Zusatz der Adsorptionsmatrix sowohl Nukleinsäuren schädigende als auch die enzymatische Manipulation hemmende Substanzen weitgehend abgetrennt. Die durch das erfindungsgemäße Verfahren stabilisierten Nukleinsäuren können daher über längere Zeit gelagert werden. Darüber hinaus werden bei einer Amplifikation der durch Zusatz einer Adsorptionsmatrix behandelten Nukleinsäuren, z.B. durch PCR, reproduzierbare Ergebnisse erhalten. Diese Reproduzierbarkeit ist essentiell für die Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse bei der Nukleinsäure-Analyse. Die hohe Qualität der durch das erfindungsgemäße Verfahren gereinigter Nukleinsäuren zeigt sich beispielsweise darin, daß sie direkt durch Sequenzierung oder Heteroduplexanalyse untersucht werden können. Eine Klonierung ist nicht notwendig. Außerdem müssen beim erfindungsgemäßen Verfahren keine gesundheitsschädigenden Lösungsmittel eingesetzt werden.

Die beim erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Adsorptionsmatrix ist derart beschaffen, daß sie Verunreinigungen, die zur Schädigung von Nukleinsäuren führen oder/und die Durchführung enzymatischer Reaktionen verhindern oder/und enzymatische Reaktionen hemmen, wie etwa Abbauprodukte von Hämoglobin, z.B. Bilirubin und dessen Abbauprodukte, oder/und Gallensäuren oder Salze davon oder deren Abbauprodukte sowie andere Abbauprodukte pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, binden kann. Vorzugsweise verwendet man eine unlösliche Adsorptionsmatrix, da in diesem Fall eine leichtere Abtrennung von der Probe möglich ist.

Gute Ergebnisse werden mit einer Adsorptionsmatrix auf Basis von Kohlenhydraten oder/und Polypeptiden erhalten. Bevorzugt ist eine Adsorptionsmatrix auf Basis von Kohlenhydraten, z.B. eine Adsorptionsmatrix, die Polysaccharide enthält. Besonders bevorzugt verwendet man eine Adsorptionsmatrix, die α - oder/und β -glykosidisch verknüpfte Kohlenhydrate enthält, z.B. Stärke,

- 4 -

Cellulose, Glykogen oder/und andere biogene oder nichtbiogene Kohlenhydrate sowie Derivate oder Mischungen davon.

Am meisten bevorzugt ist die Verwendung von Mehlen, d.h. im wesentlichen einer Mischung von Cellulose, Stärke, Lipiden und Salzen oder Bestandteilen daraus. Als geeignet haben sich beispielsweise Mehle aus Getreide, Mais, Erbsen, Soja und Kartoffeln oder Bestandteile daraus bzw. Mischungen davon, erwiesen. Für einen Fachmann ist es selbstverständlich, daß neben den genannten Mehlsorten auch andere Mehlsorten bzw. Mischungen von mehreren Mehlsorten oder Bestandteilen daraus eingesetzt werden können. Am meisten bevorzugt ist die Verwendung von Kartoffelmehl oder Bestandteilen daraus. Ebenso bevorzugt sind Mischungen aus gereinigten Kohlenhydraten, z.B. Cellulose, und Mehlen, z.B. Kartoffelmehl.

Weiterhin bevorzugt ist die Verwendung einer Adsorptionsmatrix auf Kohlenhydratbasis zusammen mit löslichen Bestandteilen aus Mehlen, insbesondere aus einer oder mehreren der obengenannten Mehlsorten.

Die Menge, in der die Adsorptionsmatrix der biologischen Probe zugesetzt wird, hängt im wesentlichen von der Beschaffenheit der Probe, d.h. der Menge an Verunreinigungen, ab. Gute Ergebnisse wurden erhalten, wenn man die Adsorptionsmatrix in einem Gewichtsanteil von 0,05 : 1 bis 100 : 1 bezüglich der Nukleinsäuren enthaltenden Probe verwendet. Besonders bevorzugt wird die Adsorptionsmatrix in einer Menge von 0,1 : 1 bis 10 : 1 zugesetzt.

Die Nukleinsäuren enthaltende Probe, die durch das erfindungsgemäße Verfahren stabilisiert werden soll, stammt aus biologischen Materialien, die Nukleinsäuren abbauende bzw. enzymatische Reaktionen hemmende Verunreinigungen enthalten. Vorzugsweise stammt die Nukleinsäuren enthaltende Probe aus Fäkalien. Sie kann jedoch auch beispielsweise aus anderen Quellen, z.B. Geweben jeder Art, Knochenmark, humanen und tierischen Körper-

- 5 -

flüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Urin, Sperma, Cerebrospinalflüssigkeit, Sputum und Abstrichen, Pflanzen, Pflanzenteilen und -extrakten, z.B. -säften, Pilzen, Mikroorganismen wie Bakterien, fossilen oder mumifizierten Proben, Bodenproben, Klärschlamm, Abwässern und Lebensmitteln stammen. Als Verunreinigungen können beispielsweise Abbauprodukte von Hämoglobin, wie etwa Bilirubin und dessen Abbauprodukte, oder/und Gallensäuren oder Salze davon oder deren Abbauprodukte, aber auch andere Arten von Verunreinigungen enthalten sein.

Zur besseren Handhabung des Verfahrens hat es sich als günstig erwiesen, die Probe aus biologischen Materialien vor dem Zusatz der Adsorptionsmatrix in einer Pufferlösung aufzunehmen. Die Inkubation der Probe mit der Adsorptionsmatrix kann bei Raumtemperatur erfolgen. Die Inkubationsdauer kann in weiten Bereichen variiert werden. Nach der Inkubation kann die Adsorptionsmatrix z.B. durch Zentrifugation von der Probe abgetrennt werden. Alternativ kann die Probe direkt mit der Adsorptionsmatrix versetzt werden, z.B. bei flüssigen biologischen Proben. Weiterhin kann die Probe über eine Adsorptionsmatrix durch Zentrifugation, durch Anlegen eines Vakuums oder/und mittels der Schwerkraft geführt werden, wobei die Adsorptionsmatrix vorzugsweise dann abgefüllt in einer Säule vorliegt.

Die Behandlung mit der Adsorptionsmatrix führt zu einer signifikanten Stabilitätserhöhung der in der Probe enthaltenen Nukleinsäuren und bei einer anschließenden Isolierung der Nukleinsäuren zu einer besseren Reproduzierbarkeit. Dies gilt insbesondere, wenn sich an die Isolierung eine enzymatische Manipulation der Nukleinsäuren, z.B. eine Amplifikation oder/und eine Restriktionsspaltung anschließt. Besonders bevorzugt wird die Amplifikation, z.B. durch PCR (Polymerase Chain Reaction), LCR (Ligase Chain Reaction), NASBA (Nucleic Acid Base Specific Amplification) oder 3SR (Self Sustained Sequence Replication) durchgeführt.

- 6 -

Ein besonders bevorzugter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Analyse, der Nachweis oder die Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere DNA, aus Stuhlproben. Durch das erfindungsgemäße Verfahren sind saubere und amplifizierbare Nukleinsäuren aus fäkalen Proben erhältlich, die zum Nachweis von Mutationen, insbesondere von tumorspezifischen DNA-Mutationen verwendet werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren besitzt große Bedeutung für die Tumordiagnostik, da es den spezifischen Nachweis nukleärer eukaryotischer Nukleinsäuren in Gegenwart von Verunreinigungen und großer Mengen an bakteriellen Nukleinsäuren ermöglicht.

Durch Analyse von Stuhl-DNA unter Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens können Tumoren des Verdauungstrakts, insbesondere Pankreas- oder Darmtumoren, früher und genauer diagnostiziert werden. Diese Diagnose erfolgt beispielsweise durch Untersuchung von Onkogenen oder/und Tumorsuppressorgenen auf tumorspezifische DNA-Mutationen. Da Zellen von Tumoren des Verdauungstraktes laufend in den Stuhl abgeschilfert werden, ist eine Detektion von tumorspezifischen DNA-Mutationen im Stuhl durch das erfindungsgemäße Verfahren möglich. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt außerdem das Monitoring von Therapien, die im Hinblick auf die Eliminierung eines Tumors eingeschlagen wurden, sowie die regelmäßige und verlässliche Durchführung von Tumorpräventionsuntersuchungen.

Im Gegensatz zum einzigen, aus dem Stand der Technik bekannten nicht-invasiven Routinetest auf kolorektale Tumoren, dem Test auf okkultes Blut im Stuhl, kommt es beim erfindungsgemäßen Verfahren nicht bzw. nur sehr selten zu falsch-positiven Ergebnissen. Darüber hinaus ermöglicht der Nachweis von Mutationen in Genen, die schon im Adenomstadium, d.h. in einem sehr frühen Stadium der Tumorprogression mutieren, eine deutlich frühere und spezifischere Diagnose als der Stuhl-Bluttest. Als geeignete Objekte der Mutationsanalysen können insbesondere das Tumorsupressorgen APC (Adenomatöse Polyposis

- 7 -

Coli) (Fearon und Vogelstein (1990), Cell 61, 759-761) und das ras-Onkogen verwendet werden. Durch Mutationsanalysen dieser beiden Gene in DNA aus Stuhlproben können insbesondere Darmtumoren, z.B. Dickdarmtumoren, und Pankreastumoren erfaßt werden. Neben dem APC-Gen und dem ras-Gen können natürlich auch weitere tumorrelevante Gene für die Krebsdiagnose als Analyseobjekte dienen.

Abgesehen von tumorrelevanten Genen können auch nicht-translatierte repetitive Abschnitte des Genoms als Analyseobjekte in der Krebsdiagnose dienen. Diese sogenannten Mikrosatellitenabschnitte werden amplifiziert und das gelelektrophoretisch erhaltene Bandenmuster mit dem Bandenmuster von DNA aus gesundem Körpermateriel desselben Patienten verglichen. Unterschiedliche Bandenmuster können Hinweise auf das Vorhandensein eines Tumors liefern.

Ein weiteres Beispiel für die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist eine genaue Identifikation von Personen durch Untersuchung der aus Fäkalien oder Körpermateriel gereinigten Nukleinsäuren in der forensischen Analyse. Dazu werden repetitive polymorphe Abschnitte des Genoms amplifiziert und die Amplifikationsprodukte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Durch einen Vergleich der erhaltenen Bandenmuster mit den Mustern von DNA anderer verdächtiger oder eng verwandter Personen kann dann die betreffende Person identifiziert werden.

Eine weitere wichtige Anwendung für die erfindungsgemäße Isolierung von DNA aus fäkalen Proben sind zoobiologische populationsgenetische, evolutionsgenetische und botanische Studien und Untersuchungen von Tieren und Pflanzen. Bisher scheitern derartige Untersuchungen sehr häufig an der Seltenheit einer Tierart und der geringen Wahrscheinlichkeit, die betreffenden Tiere an einem bestimmten Ort anzutreffen. Bei Kenntnis des ungefähren Aufenthaltsortes kann eine Analyse von zurückgelassenen Fäkalien durch das erfindungsgemäße Verfahren wichtige Hinweise auf den Verwandtschaftsgrad der Tiere, auf

zurückgelegte Wanderungswege oder auf die Nahrungsgewohnheiten der Tiere liefern. Ebenso können aus der Analyse fäkaler Nukleinsäuren, z.B. durch Nachweis mikrobieller oder viraler Nukleinsäuren, wichtige diagnostische Informationen über Infektionen, z.B. bakterieller oder viraler Art abgeleitet werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Reagenzienkit zur Stabilisierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, umfassend:

- (a) einen zur Aufnahme einer Nukleinsäuren enthaltenden Probe geeigneten Puffer und
- (b) eine Adsorptionsmatrix zur Bindung von Verunreinigungen aus den biologischen Materialien.

Die Adsorptionsmatrix kann in einer abgepackten portionierten Form, z.B. abgefüllt in einer Säule wie etwa einer zentrifugierbaren Minisäule, vorliegen.

Vorzugsweise enthält das Reagenzienkit zusätzliche Mittel zur Reinigung von Nukleinsäuren, die z.B. mineralische oder/und organische Träger sowie gegebenenfalls Lösungen, Hilfsstoffe oder/und Zubehör umfassen. Mineralische Bestandteile von Trägern können beispielsweise poröse oder nicht-poröse Metalloxide oder Metallmischoxide, z.B. Aluminiumoxid, Titandioxid oder Zirkoniumdioxid, Silicagele, Materialien auf Basis von Gläsern, z.B. modifizierte oder nicht-modifizierte Glaspartikel oder Glasmehl, Quarz, Zeolithe oder Mischungen von einer oder mehrerer der obengenannten Substanzen sein. Andererseits kann der Träger auch organische Bestandteile enthalten, die z.B. aus gegebenenfalls mit funktionellen Gruppen modifizierten Latexpartikeln, synthetischen Polymeren, wie etwa Polyethylen, Polypropylen, Polyvinylidenfluorid, insbesondere ultrahochmolekularem Polyethylen oder HD-Polyethylen, oder Mischungen

- 9 -

von einer oder mehreren der zuvor genannten Substanzen ausgewählt werden.

Der Träger kann beispielsweise in Form von Partikeln mit einer mittleren Größe von 0,1 μm bis 1000 μm vorliegen. Bei Verwendung eines porösen Trägers ist eine mittlere Porengröße von 2 μm bis 1000 μm bevorzugt. Der Träger kann beispielsweise in Form loser Schüttungen von Partikeln, Filterschichten, z.B. aus Glas, Quarz oder Keramik, Membranen, z.B. Membranen, in denen ein Silicagel angeordnet ist, Fasern oder Geweben aus mineralischen Trägern, wie etwa Quarz oder Glaswolle sowie in Form von Latices oder Frittenmaterialien aus synthetischen Polymeren vorliegen.

Weiterhin kann das Reagenzienkit auch noch geeignete Lösungen, z.B. Waschlösungen oder Pufferlösungen zur Aufnahme der Probe enthalten. Ein zur Aufnahme einer Nukleinsäuren enthaltenden Probe geeigneter Puffer ist beispielsweise ein Puffersystem auf Basis von Tris-HCl pH 8,5-9,5, EDTA und gegebenenfalls NaCl. Ein besonders bevorzugter Puffer, insbesondere zur Aufnahme von Stuhlproben, enthält 500 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM EDTA und 10 mM NaCl.

Außerdem kann das erfindungsgemäße Reagenzienkit auch Hilfsstoffe wie Enzyme und andere Mittel zur Manipulation von Nukleinsäuren enthalten, z.B. mindestens einen Amplifikationsprimer und zur Amplifikation von Nukleinsäuren geeignete Enzyme, z.B. eine Nukleinsäurepolymerase oder/und mindestens eine Restriktionsendonuklease.

Die Primer zur Amplifikation von Nukleinsäuren stammen zweckmäßigerweise aus den zu analysierenden Genen, d.h. beispielsweise aus Onkogenen, Tumorsuppressorgenen oder/und Mikrosatellitenabschnitten. Zur Amplifikation von Nukleinsäuren geeignete Enzyme und Restriktionsendonukleasen sind bekannt und kommerziell erhältlich.

- 10 -

Weiterhin soll die vorliegende Erfindung durch das nachfolgende Beispiel erläutert werden.

Beispiel 1

Analyse von DNA aus Stuhlproben

Es wurden folgende Adsorptionsmatrizen getestet: Immobilisiertes Rinderserum-Albumin (RSA), Cellulose und Kartoffelstärke (alle von Sigma, München, DE) und Kartoffelmehl (Honig, Postbus 45, 1540 AA Koog a/d Zaan, NL), bei dem es sich im wesentlichen um eine unlösliche Mischung aus Cellulose, Stärke, Lipiden und Salzen handelt.

Menschliche Stuhlproben wurden gesammelt, eingefroren und bei - 80°C aufbewahrt. 200 mg Stuhl wurden in 600 µl Stuhl-Lösepuffer (SLP: 500 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM EDTA, 10 mM NaCl) homogenisiert. Zu jeweils 1/4 des Homogenats wurden 200 µl SLP mit 100 mg der jeweiligen Adsorptionsmatrix gegeben. Die Mischung wurde heftig vermischt und zweimal bei 500 x g bzw. 13000 x g für jeweils 5 min zur Präzipitation von Bakterien und anderen Verunreinigungen zentrifugiert. Nach Behandlung des klaren Überstands mit Proteinase K in einer Konzentration von 2,5 mg/ml wurde die DNA unter Verwendung einer DNA-Spinsäule (Qiagen, Hilden, DE) gereinigt, die zur DNA-Reinigung aus Blut und Gewebe geeignet ist. Die Säulenbeladung und Waschschriffe wurden wie vom Hersteller angegeben, durchgeführt.

Die DNA wurde dann aus der Spinsäule in einem Endvolumen von 150 µl destillierten Wasser eluiert und bis zur Verwendung bei - 20°C aufbewahrt. Die Ausbeute an chromosomaler DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt.

Alle Präparationen zeigten vergleichbare Gesamt-DNA-Mengen von 15-20 µg. Auf einem analytischen Agarosegel waren keine Unterschiede zwischen der genomischen DNA aus Präparationen mit und ohne Adsorptionsmatrix zu erkennen. Durch Zugabe der

- 11 -

Adsorptionsmatrix wurde auch keine Erhöhung in der Ausbeute der extrahierten chromosomalen DNA festgestellt.

Zum Test der Stabilität der isolierten Nukleinsäuren wurde die DNA nach einwöchiger Aufbewahrung untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt. Die stabilsten DNA-Proben wurden nach Verwendung von Kartoffelmehl als Adsorptionsmatrix erhalten.

Für die Amplifizierung durch PCR wurden 3 µl der gereinigten chromosomalen DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl verwendet, das 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM/MgCl₂, 30 µM jeweils dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 400 nM jedes Primers, 100 µg/ml RSA und 0,75 Einheiten Taq-Polymerase (AGS, Heidelberg, DE) enthielt.

Zur Sensitivitätsbesserung wurden Nested-PCR-Methoden (vgl. Jackson et al., (1991), in McPherson, N.J. Quirke, P. Taylor, G.R. (Hrsg.), PCR-A Practical Approach, Oxford University Press) unter Verwendung von Biotin-markierten Nested-Primern durchgeführt. Eine PCR von in Abwesenheit einer Adsorptionsmatrix gereinigten DNA-Proben war vollständig blockiert. Durch Zusatz von RSA, Cellulose oder Kartoffelstärke als Adsorptionsmatrix konnten teilweise reproduzierbare PCR-Ergebnisse erhalten werden (Tabelle 1).

Reproduzierbare PCR-Ergebnisse in allen zehn analysierten Proben wurden bei Verwendung von Kartoffelmehl als Adsorptionsmatrix erhalten. Die PCR-Fragmente waren zur Verwendung bei der Heteroduplexanalyse und auch zur direkten Sequenzierung geeignet. Hierzu erfolgte eine Präparation von einzelsträngiger DNA unter Verwendung von Streptavidin-gekoppelten Magnetbeads (Dynal, Hamburg, DE) gemäß den Angaben des Herstellers.

- 12 -

TABELLE 1: Eigenschaften von nukleärer DNA aus Stuhl

Matrix	Verlust ^a	PCR ^b
-	80 %	0
RSA	60 %	3
Cellulose	60 %	4
Kartoffelstärke	60 %	4
Kartoffelmehl	< 5 %	10

^a Der DNA-Verlust durch Abbau wurde nach Aufbewahrung für 1 Woche bei - 20°C durch analytische Agarosegelelektrophorese und spektrophotometrische Analyse gemessen.

^b Es wurde eine PCR von DNA aus zehn verschiedenen Stuhlproben durchgeführt. Es ist die Anzahl von Proben angegeben, die durch PCR analysierbar waren.

Beispiel 2

Reinigung von Stuhlproben

Verwendete Puffer:

Puffer SLP: (siehe Beispiel 1)

Puffer A: 5,6 M Guanidinium/HCl; 20% Tween 20

Puffer B: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 70% Ethanol

Puffer C: 10 mM Tris/HCl pH 9,0; 0,5 mM EDTA

Von einer gefrorenen Stuhlprobe wurden 3 g eingewogen und mit 2 ml Puffer SLP durch gründliches Vortexen gemischt. Anschließend wurde eine Säule mit einer 1:1 Mischung (w/w) aus Kartoffelmehl und Cellulose gefüllt und in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen gesteckt. Die in Puffer aufgenommene Probe wurde

- 13 -

in diese Säule überführt und durch Zentrifugation bei 500 Upm für 5 Min von Verunreinigungen geklärt.

Zu 1,2 ml geklärter Probe wurden 0,125 ml Proteinase K-Stamm-lösung (1,785 mg/ml) und 1,2 ml Puffer A gegeben. Die Probe wurde durch Vortexen für 1 Min gemischt und anschließend für 10 Min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 1,3 ml absolutem Alkohol und gründlichem Mischen wurde die Lösung in eine Qia-AMP-Midisäule (Qiagen) transferiert und die Nukleinsäuren durch Zentrifugation auf einer Silikamatrix gebunden.

Die gebundenen Nukleinsäuren wurden durch zweimaliges Waschen mit 2,5 ml Puffer B gereinigt und mit 0,5 ml Puffer C von der Qia-AMP-Midisäule eluiert und zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Bei einer wie in Beispiel 1 durchgeführten PCR an den gelagerten Proben konnten reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Reinigung, Stabilisierung oder/und Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, dadurch gekennzeichnet, daß man einer Nukleinsäuren enthaltenden Probe aus biologischen Materialien eine Adsorptionsmatrix zur Bindung von Verunreinigungen zusetzt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Adsorptionsmatrix auf Kohlenhydratbasis verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Adsorptionsmatrix verwendet, die α - oder/ und β -glykosidisch verknüpfte Kohlenhydrate enthält.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Adsorptionsmatrix verwendet, die Stärke, Cellulose, Glykogen oder/und andere biogene oder nicht-biogene Kohlenhydrate oder Mischungen davon enthält.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß man als Adsorptionsmatrix ein Mehl aus Getreide, Erbsen, Mais, Soja, Kartoffeln oder Bestandteile daraus oder Mischungen davon verwendet.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man Kartoffelmehl oder Bestandteile daraus verwendet.

- 15 -

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine Adsorptionsmatrix auf Kohlenhydratbasis
zusammen mit löslichen Bestandteilen aus Mehlen verwendet.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Adsorptionsmatrix Mischungen aus gereinigten
Kohlenhydraten oder/und Mehlen verwendet.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Adsorptionsmatrix Mischungen aus Cellulose und
Kartoffelmehl verwendet.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Adsorptionsmatrix in einem Gewichtsanteil von
0,05 : 1 bis 100 : 1 bezüglich der Nukleinsäuren enthal-
tenden Probe zusetzt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Nukleinsäuren enthaltende Probe aus menschlichen
oder tierischen Geweben, Knochenmark, Körperflüssigkeiten,
Pflanzen, Pflanzenteilen und -extrakten, Pilzen, Mikroor-
ganismen, fossilen oder mumifizierten Proben, Bodenproben,
Klärschlamm, Abwässern, Fäkalien und Lebensmitteln stammt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-11,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Nukleinsäuren enthaltende Probe als Verunrei-
nigungen Substanzen mit Nukleinsäuren schädigender
oder/und enzymatische Reaktionen hemmender Wirkung
enthält.

- 16 -

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-12,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Nukleinsäuren enthaltende Probe als Verunreinigungen Abbauprodukte von Hämoglobin oder/und Gallensäuren oder Salze davon oder/und Abbauprodukte pflanzlichen oder tierischen Ursprungs enthält.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-13,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Probe aus biologischen Materialien vor dem Zusatz der Adsorptionsmatrix in einer Pufferlösung aufnimmt.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-14,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Probe aus biologischen Materialien direkt mit der Adsorptionsmatrix versetzt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-15,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Probe durch Zentrifugation, durch Anlegen eines Vakuums oder/und mittels der Schwerkraft über die Adsorptionsmatrix führt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-16,
dadurch gekennzeichnet,
daß sich an die Isolierung der Nukleinsäuren deren direkte Analyse anschließt.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-17,
dadurch gekennzeichnet,
daß sich an die Isolierung eine enzymatische Manipulation der Nukleinsäuren anschließt.
19. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,

- 17 -

daß die enzymatische Manipulation eine Amplifikation oder/und eine Restriktionsspaltung umfaßt.

20. Verfahren nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Amplifikation durch PCR (Polymerase Chain Reaction), LCR (Ligase Chain Reaction), NASBA (Nucleic Acid Base Specific Amplification) oder 3SR (Self Sustained Sequence Replication) erfolgt.
21. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1-20 zur Analyse, zum Nachweis oder zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Stuhlproben.
22. Verwendung nach Anspruch 21 zum Nachweis von DNA-Mutationen.
23. Verwendung nach Anspruch 21 oder 22 zur Analyse, zum Nachweis oder zur Isolierung nukleärer eukaryontischer Nukleinsäuren.
24. Verwendung nach Anspruch 23 zur Diagnostik von Tumoren des Verdauungstrakts, insbesondere von Pankreas- oder Darmtumoren.
25. Verwendung nach Anspruch 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Onkogene, Tumorsuppressorgene oder/und Mikrosatellitenabschnitte untersucht.
26. Verwendung nach Anspruch 23 zur Untersuchung von Tieren und Pflanzen.
27. Verwendung nach Anspruch 21 zum Nachweis mikrobieller oder viraler Nukleinsäuren.

- 18 -

28. Verwendung nach Anspruch 27 zur Diagnostik bakterieller und viraler Infektionen.
29. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1-20 zum Verwandtschaftsnachweis und zur forensischen Identifikation von individuellen Personen.
30. Reagenzienkit zur Reinigung und Stabilisierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, umfassend:
 - (a) einen zur Aufnahme einer Nukleinsäuren enthaltenden Probe geeigneten Puffer und
 - (b) eine Adsorptionsmatrix zur Bindung von Verunreinigungen aus den biologischen Materialien.
31. Reagenzienkit nach Anspruch 30, zusätzlich umfassend Mittel zur weiteren Reinigung von Nukleinsäuren.
32. Reagenzienkit nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel zur weiteren Reinigung von Nukleinsäuren mineralische oder/und organische Träger sowie gegebenenfalls Lösungen, Hilfsstoffe oder/und Zubehör umfassen.
33. Reagenzienkit nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger mineralische Bestandteile aus porösen oder nichtporösen Metalloxiden oder Metallmischoxiden, Silicagelen, Materialien auf Basis von Gläsern oder Quarz, Zeolithen oder Mischungen davon enthält.
34. Reagenzienkit nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger organische Bestandteile aus gegebenenfalls modifiziertem Latex, synthetischen Polymeren oder Mischungen davon enthält.

- 19 -

35. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 32-34,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Träger in Form von Partikeln mit einer mittleren
Größe von 0,1 μm bis 1000 μm vorliegt.
36. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 32-35,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Träger Poren mit einer mittleren Größe von 2 μm
bis 1000 μm aufweist
37. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 32-36,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Träger in Form loser Schüttungen von Partikeln,
Filterschichten, Membranen, Geweben, Fasern oder Fritten
vorliegt.
38. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 30-37,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Adsorptionsmatrix in einer Säule abgefüllt ist.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/EP 96/03595

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 393 744 (EASTMAN KODAK CO) 24 October 1990 see the whole document	1-31
X	EP,A,0 389 063 (AKZO NV) 26 September 1990 see the whole document	30-38
A	EP,A,0 574 267 (GEN PROBE INC) 15 December 1993 see page 4, line 15-20	1-38
A	EP,A,0 189 280 (DEKALB PFIZER GENETICS) 30 July 1986 see page 3, line 25-36	1-9
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 October 1996

Date of mailing of the international search report

19. 11. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2210 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hagenmaier, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. of Application No

PCT/EP 96/03595

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,93 20235 (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCH00) 14 October 1993 cited in the application see the whole document ---	1-38
P,X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 23, no. 18, 25 September 1995, pages 3800-3801, XP002017414 DEUTER ET AL.: "A METHOD FOR PREPARATION OF FECAL DNA SUITABLE FOR PCR" see the whole document -----	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/03595

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0393744	24-10-90	US-A- 5334499	02-08-94
		AT-T- 117377	15-02-95
		CA-A- 2013316	17-10-90
		DE-D- 69016079	02-03-95
		DE-T- 69016079	14-09-95
		EP-A- 0620282	19-10-94
		JP-A- 2292298	03-12-90
		JP-B- 7002120	18-01-95
EP-A-0389063	26-09-90	NL-A- 8900725	16-10-90
		AU-B- 641641	30-09-93
		AU-A- 5215390	27-09-90
		CA-A- 2012777	23-09-90
		DE-T- 389063	10-10-96
		ES-T- 2085245	01-06-96
		JP-A- 2289596	29-11-90
		US-A- 5234809	10-08-93
EP-A-0574267	15-12-93	AU-B- 668746	16-05-96
		AU-A- 4535593	04-01-94
		CA-A- 2137690	23-12-93
		JP-T- 8501208	13-02-96
		WO-A- 9325711	23-12-93
EP-A-0189280	30-07-86	JP-A- 61234799	20-10-86
WO-A-9320235	14-10-93	CA-A- 2132874	14-10-93
		EP-A- 0672181	20-09-95
		JP-T- 8504081	07-05-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 96/03595

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12Q1/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole) IPK 6 C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 393 744 (EASTMAN KODAK CO) 24.Oktober 1990 siehe das ganze Dokument ---	1-31
X	EP,A,0 389 063 (AKZO NV) 26.September 1990 siehe das ganze Dokument ---	30-38
A	EP,A,0 574 267 (GEN PROBE INC) 15.Dezember 1993 siehe Seite 4, Zeile 15-20 ---	1-38
A	EP,A,0 189 280 (DEKALB PFIZER GENETICS) 30.Juli 1986 siehe Seite 3, Zeile 25-36 ---	1-9
-/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie </div> </div>		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" Altes Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 31.Oktober 1996		Abschlusssdatum des internationalen Recherchenberichts 19. 11. 96
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 MV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Hagenmaier, S

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/EP 96/03595

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO,A,93 20235 (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOOL) 14.Oktober 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-38
P,X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 23, Nr. 18, 25.September 1995, Seiten 3800-3801, XP002017414 DEUTER ET AL.: "A METHOD FOR PREPARATION OF FECAL DNA SUITABLE FOR PCR" siehe das ganze Dokument -----	1-38

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internales Aktenzeichen

PCT/EP 96/03595

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0393744	24-10-90	US-A- 5334499	02-08-94
		AT-T- 117377	15-02-95
		CA-A- 2013316	17-10-90
		DE-D- 69016079	02-03-95
		DE-T- 69016079	14-09-95
		EP-A- 0620282	19-10-94
		JP-A- 2292298	03-12-90
		JP-B- 7002120	18-01-95
EP-A-0389063	26-09-90	NL-A- 8900725	16-10-90
		AU-B- 641641	30-09-93
		AU-A- 5215390	27-09-90
		CA-A- 2012777	23-09-90
		DE-T- 389063	10-10-96
		ES-T- 2085245	01-06-96
		JP-A- 2289596	29-11-90
		US-A- 5234809	10-08-93
EP-A-0574267	15-12-93	AU-B- 668746	16-05-96
		AU-A- 4535593	04-01-94
		CA-A- 2137690	23-12-93
		JP-T- 8501208	13-02-96
		WO-A- 9325711	23-12-93
EP-A-0189280	30-07-86	JP-A- 61234799	20-10-86
WO-A-9320235	14-10-93	CA-A- 2132874	14-10-93
		EP-A- 0672181	20-09-95
		JP-T- 8504081	07-05-96